

# メダカゲノム・EST情報と突然変異体を駆使した発生・再生システムの解明

●武田 洋幸<sup>1)</sup> ◆工藤 明<sup>2)</sup>

1) 東京大学大学院理学系研究科 2) 東京工業大学大学院生命理工学研究科

## <研究の目的と進め方>

脊椎動物の基本的体制を備えた最も古い動物群である魚類は脊椎動物の進化を考える上で重要な存在である。また、小型魚類は発生・遺伝学の研究の他に、ヒレが切断後約2週間で再生することから遺伝学が可能な再生モデル動物としても注目されている。本研究では、特定領域研究「統合ゲノム」で得られたゲノム・EST情報と二つの研究室で単離された突然変異体を効率的に融合することにより、脊椎動物の発生・再生システムの全体像の理解を目指す。具体的には、有用な変異体の大規模なマッピングと原因遺伝子のクローニング、変異体における発現プロファイルの解析を中心に研究をすすめる。特に一遺伝子の変異でシステム全体（発現プロファイル）がどのように変化するか注目する。メダカのゲノム情報の基盤（ゲノム配列、EST、BACライブラリーなど）は、日本国内でほとんど整備され、また突然変異体もその多くが日本人研究者の手によって単離されている。実際、H12年より科学技術振興調整費（H12-16、総括責任者：武田洋幸）などの研究費により、メダカ突然変異体のスクリーニングを遺伝研、東京大学、東京工業大学で実施している。このスクリーニングは、中・内胚葉性器官（骨、筋肉、消化器系、循環器系など）の形成異常とヒレ再生異常を指標として行われ、既に100種類以上のメダカ変異体が単離されている。これらを有効に使うことにより、国際的な情報発信とこの分野をリードする研究拠点を作る。さらに、本研究の成果は、発生原理にとどまらず、器官再生技術を用いた再生医療の分野へも不可欠な基礎的知見を提供するものである。

## <研究開始時の研究計画>

### ① 変異体のマッピングと原因遺伝子の同定

ポジショナルクローニングにより、注目する突然変異体の原因遺伝子を同定する。16年度中に概要が完成するメダカゲノムの情報を最大限に利用すれば、変異体から出発して1年程度で原因遺伝子にたどり着く。両研究室併せて年間20～30系統のマッピング、原因遺伝子までは年間5系統程度を目指す。具体的に研究対象とするメダカ変異体は、原腸形成、左右性、甲状腺、体節形成、血球分化、心臓・血管形成、骨形成、ヒレ形成・再生に異常を示すものが中心となる。

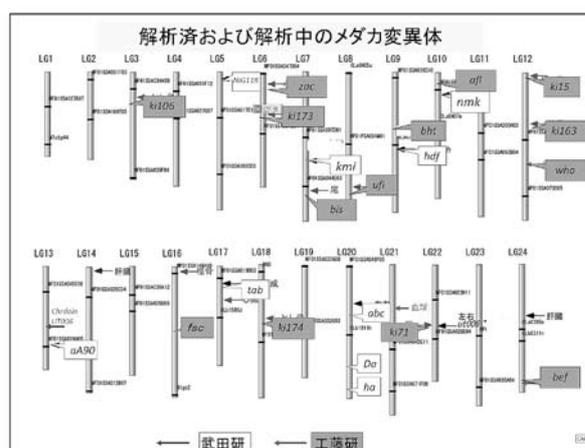
### ② 遺伝子発現プロファイルの解析

特定領域研究「統合ゲノム」において、H15年度に初期胚で発現する遺伝子、8,500個のオリゴDNAチップを作成し、発現解析を始めた。このチップと最近市販されたメダカオリゴDNAチップを用いて、原因遺伝子の判明した胚での発現解析を行って、一つの遺伝子の変異が注目する組織または胚全体の発現プロファイルに与える影響を解析する。これにより、注目した遺伝子のdownstream targetを含む遺伝子カスケードを網羅的に捉える。

## <研究期間の成果>

2006年までに、メダカドラフトゲノム (Kasahara et al., Nature, 2007)、および詳細なSNP地図、BACライブラリー等の情報が充実し、メダカ突然変異体から原因遺伝子同定の労力と時間は飛躍的に減少した。2005年から2009年の間に、武田研究室および工藤研究室において、それぞれ9系統（肝臓、体軸形成、原腸形成、左右軸変異体、内耳形成）と15系統（心臓、血球、血管、椎骨、頭蓋・ヒレ骨形成、ヒレ形成変異体）の原因遺伝子を特定し、目標を達成した。

以下にそれぞれの研究室からの代表的成果を記述する。



### I. 武田研究室

初期発生（体軸形成、体節形成、原腸形成など）および器官形成（甲状腺、肝臓など）を中心に変異体の表現型の解析と原因遺伝子の同定を行った。以下9種類の変異体の原因遺伝子が明らかになった。このうち5つの変異体の研究が論文掲載済みである。その9種類の変異体の原因遺伝子について、その名前/遺伝子名/染色体を以下に記す。

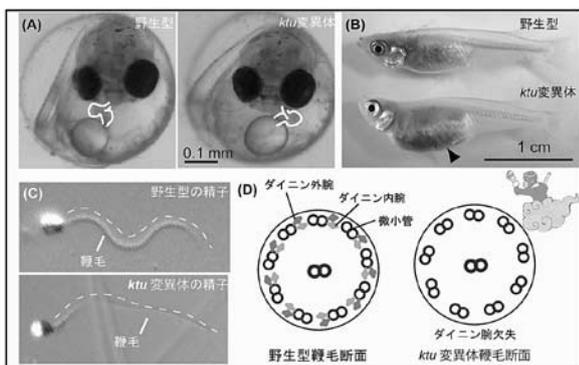
UT006/chordin LG13（頭部形成）、headfish/fgfr1 LG9（部部形成）、tab/laminin\_r1 LG17（原腸形成）、aA90/cytoplasmic dynein LG13（左右軸）、plasmic dynein2 LG、ktu/novel LG22（左右軸）、abc/PKDL1 LG20（左右軸）、ha/fat-related enzyme LG20（耳石）、nmk/abcb7 LG10（肝臓）

以下に代表的成果である、ktuとtab解析、発現解析、そして本特定計画研究代表の近藤滋博士と班員間の共同で行ったゼブラフィッシュ体節形成の原理解析についても記述する。

#### ① 左右軸変異体軸変異体 kintoun (ktu)

これまでの研究で、繊毛は幅広い生命現象に関わっており、例えば左右軸形成において、運動性繊毛が水流をつくり、その流れが左右非対称な内蔵配置を引き起こすことが知られている。一

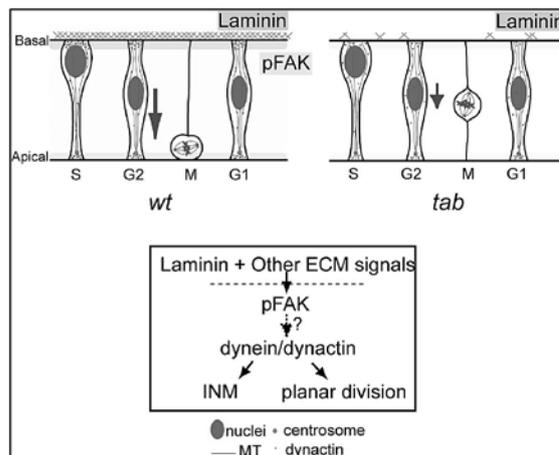
方、繊毛の形成や機能の異常によって引き起こされる遺伝病も多数知られている。代表的なものは、多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease, PKD) と繊毛病 (primary ciliary dyskinesia, PCD、一部カルタンガー症候群ともよばれる) である。両者とも複数の原因遺伝子がすでに単離されているが、200 種類以上のタンパク質で構成される繊毛の形成過程や関連する遺伝病の全体像はまだ謎である。左右軸形成に異常を示すメダカ突然変異体 *ktu* は、内臓配置がランダムになる左右軸喪失の変異体で、さらに必ず多発性嚢胞腎を発症し、下腹部がふくれ背筋が曲がる。この姿が孫悟空が空を飛ぶために用いる筋斗雲 (きんとうん) に似ていることから、変異体は *kintoun (ktu)* と名付けられた。詳しい表現型の解析により、*ktu* 変異体では繊毛のダイニンアームが欠失するために運動性を喪失する典型的な繊毛病であることが判明した。ポジショナルクローニングにより同定された原因遺伝子は、脊椎動物から単細胞生物 (クラミドモナスなど) まで保存された全く新しい遺伝子であった。次にヒト遺伝病との関連を H. Omran 教授 (フライブルグ大学) との共同で調べた。遺伝的に繊毛病を発症する 100 家系のゲノム DNA を調べた結果、2 家系でヒト *Ktu* 遺伝子の変異があることが見つかった。さらに、D. R. Mitchell および神谷律教授 (東京大学・生物科学専攻) との共同で、クラミドモナスの変異体 *pf13* (鞭毛の運動性喪失) の原因遺伝子も *ktu* の相同遺伝子であること、相賀裕美子教授 (国立遺伝学研究所) と共同で作成したノックアウトマウスが典型的な繊毛症の表現型を示すことが判明した。つまり *ktu* 遺伝子の変異は、ヒト、マウス、メダカ、クラミドモナスにおいて繊毛・鞭毛の運動能喪失をもたらしたのである。クラミドモナスとマウスを用いた生化学的解析から、新規遺伝子がコードするタンパク質は、細胞質内でダイニン前駆体の形成に必要な細胞質タンパク質であること結論した。このようにメダカ変異体の単離がきっかけとなり、生物界に広く存在する繊毛・鞭毛の複雑な形成過程の理解が進んだ (Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T. et al., Nature (Article), 2008)。



## ②ラミニン変異体 *tab* を用いた神経組織構築の解析

基底膜は、細胞外基質により形成される特徴的構造で、組織構造の維持や細胞の分化、移動など発生のような過程に重要な機能を持つ。基底膜の形成や機能には、その主要構成成分である三量体糖タンパク質 Laminin が必須である。tacobo (*tab*) 変異体は、放射線医学研究所と共同のスクリーニングで得られたメダカ ENU 誘発突然変異体であり、神経管、脊索、網膜、胸鰭などに形態異常を示す。*tab* の positional cloning を行った結果、*tab* locus は laminin  $\gamma$  1 (*lam*  $\gamma$  1) 鎖をコードすることが判明し、Laminin1 タンパク質が、変異体において著しく減少していることが明らかとなった。*tab* では神経管の形態異常が最初に認められる。この原因を探るため、脳の領域化について領域 marker の

発現を観察した結果、*tab* においても脳の領域化は正常に行われていることが分かった。さらに神経管での分裂細胞の分布を観察した。その結果、*tab* においては分裂細胞が神経管の脳室面 (apical) に局在せず、管内に散在することが判明した。神経管上皮細胞では、分裂時に細胞体が apical 側へ移動し、分裂後に basal 側に戻る、いわゆるエレベータ運動を示す。この運動は、未分化神経細胞が分化誘導因子に曝露される時間を制御することで神経細胞の分化と未分化の状態を調節しているとされる。細胞外基質とこのエレベータ運動の関係はまったくわかっておらず、この現象に焦点を当てて研究を進めた。その結果、ラミニンは、インテグリン-FAK-microtubule 系を通して、細胞核の移動と分裂の方向を制御していることが判明した (Stsuda et al., J. Cell Sci., in press)。



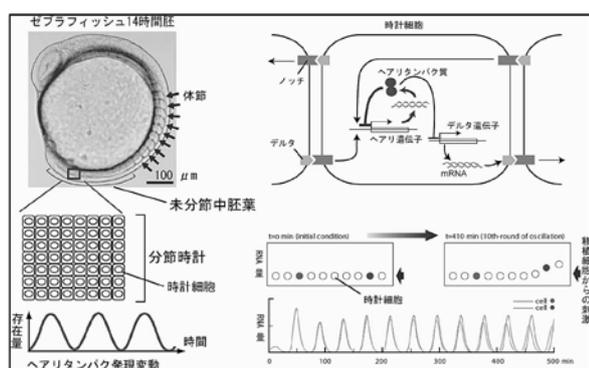
## ③遺伝子発現プロファイルの解析

一つの遺伝子の変異がシステム全体に影響を及ぼす過程は、medaka microarray を用いて、nmk 変異体と Da 変異体で解析した。脂肪肝を発症する変異体 *nmk* は、ABC トランスポーターの一つ *abcb7* が原因遺伝子であった。マクロアレイを用いた発現解析の結果、肝臓で鉄と脂肪代謝関連の遺伝子の発現に異常を見いだした (Miyake et al., Dev. Growth Differ. 2008)。Da 変異体は *zic1&4* のエンハンサー変異体で、体節背側での *zic* 遺伝子が特異的に消失する。これにより体幹部全体の背腹パターンが変化する。現在 Da 変異体における *zic1, 4* の下流因子を medaka microarray および Solid AB SOLiD を用いて探索している (計画員森下真一博士と協同研究)。

## ④分節時計の同調振動をもたらす分子ネットワークの解明

脊椎動物の体節の分節化はショウジョウバエとは全く異なり、前方から後方に向かって新たに節をつぎ足すやり方で進行する。脊椎動物胚の尾部では、体節の繰り返し構造を創出する“分節時計”が存在する。分節時計とは、小さな時計細胞の集合体 (数万個) で、各細胞で転写因子ヘアリ遺伝子が一定間隔で ON/OFF を繰り返している。この集合体は、同調して安定したリズムを繰り返す。時計細胞でリズムを生み出すメカニズム (抑制性転写因子の negative-feedback) は明らかになっていたが、分節時計としての作動原理は不明であった。我々は遺伝子改変や胚操作技術を駆使した実験と数理モデルによる相互検証実験を計画員員である近藤滋博士と共同で実施した。その結果、時計細胞が細胞表面のタンパク質 (Notch/Delta) を用いて互いに周期を調節しあう集団を形成した、いわゆる「結合振動系 (coupled oscillators)」の原理で分節時計が作動していることを明らかにした。またこの系では、細胞レベルで詳細に観察すると、stochastic な化学反応や細

胞分裂などによって生じた“遺伝子発現のゆらぎ”（ノイズ）が存在するが、結合振動系ではこれらノイズも効率よく吸収され、ロバスト性が保証されている。つまり個々の細胞を観察しているだけでは決してわからない、高次のロジックが存在していることを突き止めた (Horikawa et al., Nature (Article), 2006)。



## II. 工藤研究室

器官形成、中でも骨格形成のシステム解明のため、ゼブラフィッシュにはない新規な表現型の変異体 20 種類を選び、表現型の解析と原因遺伝子の同定を続けてきた。ようやく骨格、ヒレ、心臓、血球などの 15 種類の変異体の原因遺伝子が同定でき、これらの機能を基に、器官形成システムの確立と、それが破綻したヒト疾患への応用が可能になってきた。

以下に 15 種類の変異体の原因遺伝子について、その名前 / 遺伝子名 / 染色体を記す。

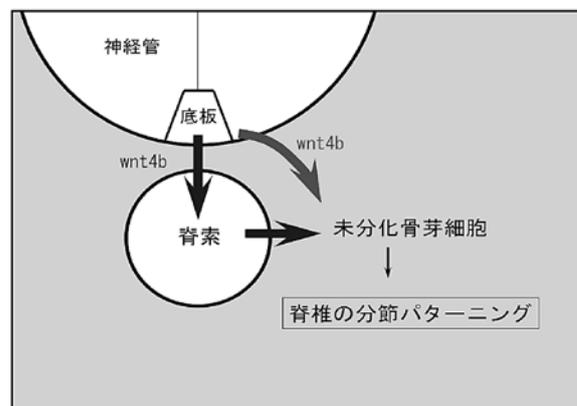
骨格変異体：fsc/wnt4a/LG16, bis/brpf1/LG7, ki173/slp/LG6, ki174/sec23d/LG18, ki106/raldh2/LG3, ki71/unknown/LG22, ki15/shp2/LG12, ki126/notch1/LG12, ヒレ・骨格変異体：ufi/hoxb8a/LG8, afl/eda/LG10, 血球変異体：who/alad/LG12, bef/c-myb/LG24, 心臓：zac/filamin-c/LG6, bht/versican/LG9, hoz/v-mhc/LG17

以上の中で 3 種類が論文掲載済み、2 種類が投稿中である。同時にこれらの変異体はすでに基礎生物学研究所のメダカリソースセンターに登録し、精子保存されているため、世界中で研究に使うことができる。

代表的な変異体を具体的に挙げると、ヒレ形成異常変異体は Hoxb8 が (坂口ら、Dev.Biol.2006) が原因遺伝子でありヒレの軌条形成を制御していること、また骨格異常変異体として体軸異常変異体では、ヒストンアセチル化に関わる brpf1 が Hox の転写制御を介して頭部とヒレの骨格形成を制御していた (日比谷ら、Dev.Biol.2009)。次に椎骨異常変異体では、小胞輸送に関与する sec24D がタイプ II コラーゲンの分泌を通して椎骨形成を抑制し (大久ら、zebrafish meeting 2008)、また特筆すべきは floor plate (底板) から分泌される wnt4b が椎骨のパターニングに関与するという、これまで全く想像していなかった底板の機能を発見した (猪早ら、日本発生物学会 2009, 論文投稿中: Nature revised, 下右図参照)。さらに、Brpf1 についてはその複合体を構成する Moz ノックアウトマウスを解析し、brpf1 の機能は脊椎動物共通であることが明らかになった。

一方、骨格と同じ中胚様由来の器官に心臓がある。骨格と心臓はメカニカルストレスに反応し、リモデリングする器官であり、多くの分子を共用していることが指摘されている (Lincoln et al; Hearts and bones, Dev Biol 2006)。我々はメカニカルストレスに

関連した表現型を持つ心臓異常変異体から原因遺伝子を単離し、その結果 1 つは筋節の形成に関与する filamin C であり、もう 1 つは心室特異的ミオシン重鎖であった。共に心筋の物理的な力に反応する遺伝子であり、特に filamin C 変異体は筋肉にも異常がみられ、その骨格形成への寄与が注目される。



このようにメカニカルストレスが器官形成・再生と関連することが示唆され、新しいシステムの構築が可能になる。我々はこれまでヒレ再生のメカニズム解析を進めてきたが (Katogi et al. Mech. Dev. 2004, Nishidate et al, Dev. Dyn. 2007, Yoshinari et al. Dev. Biol. 2009)、メカニカルストレスによる損傷による組織・器官修復・再生が注目され、我々が変異体から見いだした遺伝子群の展開が可能である。一方、メダカ変異体を疾患のモデルとするためには原因遺伝子のクローニングとヒトやマウスとの関連を検討する必要がある。我々が従来から注目している、メカニカルストレス・組織修復・再生・骨格・心臓というキーワードにあてはまる分子に我々が発見したペリオスチンという細胞外マトリクス蛋白がある (堀内ら、J. Bone Miner. Res. 1999)。ペリオスチンは骨芽細胞に発現し、骨のメカニカルストレスに関与する分子として考えられていたが、ノックアウトマウスを作成した結果、歯根膜の再生に関与し、切歯の萌出を制御していた (喜井ら、BBRC 2006)。また心筋梗塞のモデルマウスではペリオスチンは梗塞部位の修復に機能することが明らかになり (島崎ら、J. Exp. Med. 2008)、メカニカルストレスに伴う組織の修復を司っていた。この心筋梗塞・肥大におけるペリオスチンの機能については国際的な競争になり、我々の研究成果の公表と同時に 2 報発表され (Oka et al Circ. Res. 2007, Kuhn et al Nat. Med. 2007)、現在ペリオスチンは心臓疾患を解決する上で重要な研究ターゲットである。このペリオスチンの最初の小型魚類研究は zebrafish で行われ、魚のメカニカルストレスを伝播する組織である筋間中隔に発現し、筋肉の発達を抑制することが明らかになった (工藤ら、Dev. Biol. 2004)。一方、ノックアウトメダカを作成する方法としてメダカ Tilling 法が開発され、阪大藤堂研との共同研究でその確立を検討してきた。メダカペリオスチンには a,b の 2 種類があり、この a,b ともにノックアウトメダカのスクリーニングに成功している。その発現パターンから 1 つのマウスペリオスチンの機能をこの 2 つで分担している可能性が考えられる。メダカでは多くの遺伝子がマウスの 1 遺伝子の機能を複数の遺伝子が分担しており、メダカのそれぞれの分担する遺伝子ごとの機能解析は、複雑な器官のしくみを解きほぐすのに非常に有利な実験系である。ペリオスチンはこの観点から、メダカ変異体で、器官形成・ヒト疾患の動物モデルとして確立するモデルとして非常に有力な遺伝子である。

## <国内外での成果の位置づけ>

ゼブラフィッシュに比べて多くの利点を有するメダカは、ユニークな突然変異体の単離とゲノム基盤の整備が強く求められてきた。これまでに武田研究室では、メダカ胚、成体からの大規模なEST単離(約14万件、全登録数の85%)、マイクロアレイの構築、SNPsを用いた高密度連鎖地図の作成、そしてメダカゲノムプロジェクトを推進してきた。これらはすべてメダカ発生遺伝学に不可欠なものであり、すでに先行するゼブラフィッシュを凌ぐ勢いである。一方、工藤研究室、武田研究室は共同で多数のメダカ特異的突然変異体の収集に成功している。今回のメダカゲノム基盤情報と変異体を組み合わせた研究は、ゼブラフィッシュで行われている国際的な研究と肩を並べ、さらにメダカの特性を生かして世界をリードするものである。

特に期間中に発表されたメダカドラフトゲノムの完成度と精度、それに伴うゲノムリソース(BACライブラリー、ESTライブラリー、SNP情報と連鎖地図等)は高く評価され、ゲノム進化、ゲノム高次構造など分野で用いられている。さらに、この情報をもとにメダカ変異体からヒト新規繊維毛病遺伝子を単離した研究(武田研、上述)は、メダカ変異体のユニークさ、有用性を示したものとして世界的に注目された。また、骨形成の研究に関して、ゼブラフィッシュでは骨形成がメダカに比べて非常に遅く、発生過程での解析がむずかしい。従って魚の骨形成では、工藤研の研究が先端的研究と高く評価されている。

## <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2つの研究室における、メダカ変異体の原因遺伝子の同定は順調に進んだ。一方変異体の表現型から出発する順遺伝学の宿命として予想されていたこととはいえ、同定された遺伝子は新規も含めて多岐にわたり、それぞれの遺伝子について詳細な機能解析に時間がかかっている。

発現プロファイルの解析では、特定領域研究「統合ゲノム」作成した8,500遺伝子および13,000遺伝子が載っているマイクロアレイで解析したが、発現量が低い(しかも重要な)遺伝子を十分に捉えきれなかった可能性があり、成果が限定的であった(Miyake et al., *Develop. Growth Differ.* 2008)。2008年からは、計画班員森下真一博士と協同研究でSolid AB SOLiDを用いた解析にシフトし、現在各種変異体について解析を続行中である。

変異体の表現型の救済や信頼できるGFP系統の作出に、BACを用いたトランスジェニック技術が不可欠であった。しかし、その技術の確立に時間を要し、2008年に当研究室で漸く実現した。この手法を用いて、変異体の原因遺伝子の確定やその制御領域の絞り込みを迅速に進めることが可能になった。

## <今後の課題、展望>

発生学、遺伝学を中心に研究を進めてきたが、特定領域の参加により、メダカゲノムを共同で解読した生物情報グループ(森下研)との共同研究の継続(Sasaki et al., *Science* 323, 401 (2009))、および周期性の創出機構でシステム生物学の近藤(滋)研との共同研究をきっかけにシステム生物学へ研究を進展させることができた。異分野の研究者との交流が重要であり、異分野との交流の重要性を実感した。今後は変異体を出発点としつつも、その遺伝子の機能と関連する遺伝子ネットワーク網羅的解析、細胞や組織レベルでの相互作用などに数理解析を積極的に取り入れていく予定である。

## <研究期間の全成果公表リスト>

### 1) 論文

### I. 武田研究室

#### 1. 番号なし

Tsuda, S., Kitagawa, T., Shigeo Takashima, Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Shima, A., Tsutsumi, M., Hori, H., Naruse, K., Ishikawa, Y., and Takeda, H.: FAK-mediated extracellular signals are essential for interkinetic nuclear migration and Planar Divisions in the neuroepithelium, *J. Cell Sci.*, in press (2010)

#### 2. 912012123

Sano, S., Takashima, S., Niwa, H., Yokoi, H., Shimada, A., Arenz, A., Wittbrodt, J., and Takeda, H.: Characterization of teleost Mdgal using a gene-trap approach in medaka (*Oryzias latipes*)., *Genesis*, 47(8), 505-13 (2009)

#### 3. 901051430

Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., Toole, E. O', Hara, C. et al.: Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins, *Nature*, 456(7222), 611 - 616 (2008)

#### 4. 901061159

Miyake, A., Higashijima, S., Kobayashi, D., Narita, T., Jindo, T., Setiamarga, D. H., Ohisa, S., Orihara, N., Hibiya, K., Konno, S. et al.: Mutation in the *abcb7* gene causes abnormal iron and fatty acid metabolism in developing medaka fish, *Dev Growth Differ*, 50(9), 703-716 (2008)

#### 5. 806191057

Takeda, T., Draft genome of the medaka fish: A comprehensive resource for medaka developmental genetics and vertebrate evolutionary biology, *Develop. Growth Differ.*, 50(s1), S157-166 (2008)

#### 6. 801202055

Shimada, A., Yabusaki, M., Niwa, H., Yokoi, H., Hatta, K., Kobayashi, D. and Takeda, H.: Maternal-zygotic medaka mutants for *fgfr1* reveal its essential role in the migration of the axial mesoderm but not the lateral mesoderm, *Development*, 135(2), 281-90 (2008)

#### 7. 708091314

Takashima S, Shimada A, Kobayashi D, Yokoi H, Narita T, Jindo T, Kage T, Kitagawa T, Kimura T, Sekimizu K, et al: Phenotypic analysis of a novel chordin mutant in medaka, *Developmental Dynamics*, 236(8), 2298-310 (2007)

#### 8. 708091431

Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y., et al: The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution, *Nature*, 447(7145), 714-719 (2007)

#### 9. 801202043

Sekimizu, K., Tagawa, M. and Takeda, H.: Defective Fin Regeneration in Medaka Fish (*Oryzias latipes*) with Hypothyroidism, *Zoological Science*, 24(7), 693-9 (2007).

#### 10.708091425

Hojo M, Takashima S, Kobayashi D, Sumeragi A, Shimada A, Tsukahara T, Yokoi H, Narita T, Jindo T, Kage T et al: Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle., *Dev. Growth Differ.*, 49(5), 395-405 (2007)

#### 11.708091442

- Ishimatsu K, Horikawa K, Takeda H., Coupling cellular oscillators: a mechanism that maintains synchrony against developmental noise in the segmentation clock, *Developmental Dynamics*, 236(6), 1416-1421
- 12.705071509  
Yokoi H., Shimada A., Carl M. Takashima, S. Kobayashi, D., Narita T., Jindo, T., Kimura T., Kitagawa K., Kage, T. et al: Mutant analyses reveal different functions of fgfr1 in medaka and zebrafish despite conserved ligand-receptor relationships, *Dev. Biol.*, 304(1), 326-37 (2007)
- 13.701151157  
Sakaguchi T, Kikuchi T, Kuroiwa A, Takeda H, and Stainier D.; The yolk syncytial layer regulates myocardial migration by influencing extracellular matrix assembly in zebrafish., *Development*, 33(20), 4063-4072 (2006)
- 14.608060956  
Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S., Takeda, H.: Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock, *Nature*, 441(7094), 719-723 (2006)
- 15.608060934  
Kobayashi, D., Takeda, H.: Development of the endoderm and gut in medaka, *Oryzias latipes.*, *Development, Growth and Differentiation*, 48(5), 283-296 (2006)
16. 608060949  
Terasaki H, Murakami H., Yasuhiko, Y., Shin-i T., Kohara, Y., Saga, Y., Takeda, H.: Transgenic analysis of medaka msp-b enhancer in somitogenesis, *Development, Growth and Differentiation*, 48(3), 153 - 168 (2006)
- 17.601311258  
Kimura T, Yoshida K, Shimada A, Jindo T, Sakaizumi M, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M., Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms., *Gene*, 363(12), 24-31 (2005)
- 18.601311248  
Shimoda N, Yamakoshi K, Miyake A, Takeda H., Identification of a gene required for de novo DNA methylation of the zebrafish no tail gene: *Developmental Dynamics*, 233(4), 1509-1516 (2005)
- 19.601311252  
Murayama E, Herbomel P, Kawakami A, Takeda H, Nagasawa H.: Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae., *Mechanisms of Development*, 122(6), 791-803 (2005)
- 20.601311255  
Kawakami A, Nojima Y, Toyoda A, Takahoko M, Satoh M, Tanaka H, Wada H, Masai I, Terasaki H, Sakaki Y, Takeda H, Okamoto H.: The zebrafish-secreted matrix protein you/scube2 is implicated in long-range regulation of hedgehog signaling., *Current Biology*, 15(5), 480-488 (2005)
- 21.601311243  
Kawahara, A., Che, Y.S., Hanaoka, R., Takeda, H., Dawid, I.B., Zebrafish GADD45{beta} genes are involved in somite segmentation., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2), 361-366 (2005)
- 22.911131438  
Kii, I., Nishiyama, T., Li, M., Matsumoto, K., Saito, M., Amizuka, N. and Kudo, A. Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture *J. Biol. Chem.* 2009 Nov 3 (Epub)
- 23.911131424  
Takayama, I., Kii, I. and Kudo, A. Expression, purification and characterization of soluble recombinant periostin protein produced by *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 2009 Jul 24 (Epub)
- 24.903061634  
Hibiya, K., Katsumoto, T., Kondo, T., Kitabayashi, I. and Kudo, A. Brpf1, a subunit of the MOZ histone acetyl transferase complex, maintains expression of anterior and posterior Hox genes for proper patterning of craniofacial and caudal skeletons. *Dev. Biol.* 329: 176-190 (2009)
- 25.0812251526  
Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A. and Kawakami, A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev Biol* 325: 71-81 (2009)
- 26.0812251508  
Kashima, TG., Nishiyama, T., Shimazu, K., Shimazaki, M., Kii, I., Grigoriadis, AE, Fukayama, M. and Kudo, A. Periostin, a novel marker of intramembranous ossification, is expressed in fibrous dysplasia and in c-Fos-overexpressing bone lesions. *Human Pathol* 40: 226-237 (2009)
- 27.0812251456  
Fukushima, N., Kikuchi, Y., Nishiyama, T., Kudo, A. and Fukayama, M. Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 21, 1044-1053 (2008)
- 28.0812221913  
Kikuchi, Y., Kashima, TG., Nishiyama, T., Shimazu, K., Morishita, Y., Shimazaki, M., Kii, I., Horie, H., Nagai, H., Kudo, A. and Fukayama, M. Periostin is expressed in pericyptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J. Histochem Cytochem* 56: 753-764 (2008)
- 29.0805011956  
Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashim a T., Amizuka, N., Li, M., Sato, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S. et al., Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction, *J. Exp. Med.*, 205, 295-303 (2008)
- 30.801172056  
Nemoto, Y., Chatani, M., Inohaya, K., Hiraki, Y., and Kudo, A., Expression of marker genes during otolith development in medaka, *Gene Expr. Patterns*, 8, 92-95 (2008)
- 31.0805012010  
Shimazaki, M., and Kudo, A., Impaired capsule formation of tumors in periostin-null mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 736-742 (2008)
- 32.0801172109  
Nakatani, Y., Nishidate, M., Fujita, M., Kawakami, A., and Kudo, A., Migration of mesenchymal cell fated to blastema is necessary for fish fin regeneration, *Develop. Growth Differ.* 2008 50(2):71-83
- 33.0806201241  
Mise, T., Iijima, M., Inohaya, K., Kudo, A. and Wada, H. Function of Pax1 and Pax9 in the sclerotome of medaka fish.

- Genesis 46: 185-192 (2008)
34. 806201257  
Moriyama, A., Kii, I., Sunabori, T., Kurihara, S., Takayama, I., Shimazaki, M., Tanabe, H., Oginuma, M., Fukayama, M., Matsuzaki, Y., Saga, Y., and Kudo, A. GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. *Genesis* 45: 90-100 (2007)
35. 801172036  
Inohaya, K., Takano, Y., and Kudo, A., The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish, *Dev Dyn*, 236, 3031-3046 (2007)
36. 801172045  
Nishidate, M., Nakatani, Y., Kudo, A., and Kawakami, A., Identification of novel markers expressed during fin regeneration by microarray analysis in medaka fish, *Dev Dyn*, 236, 2685-2693 (2007)
37. 0704251933  
Nakatani, Y., Kawakami, A. and Kudo, A. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins *Dev. Growth Differ.* 49:145-154 (2007)
38. 0702081916  
Nemoto, Y., Higuchi, K., Baba, O., Kudo, A. and Takano, Y. (+:equal correspondence) Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 40: 399-408 (2007)
39. 0608071224  
Sakaguchi, S., Nakatani, Y., Takamatsu, N., Hori, H., Kawakami, A., Inohaya, K. and Kudo, A. Medaka unextended-fin mutants suggest a role for Hoxb8a in cell migration and osteoblast differentiation during appendage formation. *Dev. Biol.* 293, 426-438 (2006)
40. 0608071206  
Fujita, M., Isogai, S. and Kudo, A. Vascular anatomy of the developing medaka, *oryzias latipes*: A complementary fish model for the cardiovascular research of vertebrate. *Dev Dyn.* 235 : 734-746 (2006)
- 2) 学会発表  
I . 武田研究室 102 件  
II . 工藤研究室 112 件
- 3) データベース  
601311315 ( データベース )  
Takeda, H., Naruse, K., Kimura, A., Narita, T., Medaka EST Database <http://medaka.lab.nig.ac.jp/>
- 4) 図書  
I . 武田研究室 日本語総説 6 件  
II . 工藤研究室 日本語総説 9 件
- 5) 研究成果による特許の出願・取得  
なし
- 6) 新聞発表  
I . 武田研究室  
1. Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T. et al.,  
Nature, 456, 611 - 616 (2008) について  
2008 年 12 月 9 日 (火) FujiSankei Buisness i 13 ページ  
「織毛異常の遺伝子 メダカ変異で発見」  
2008 年 12 月 5 日 (金) 日経産業新聞 9 ページ  
「織毛病 原因遺伝子を特定 東大、変異のメダカから」  
2008 年 12 月 04 日 (木) 日刊工業新聞 32 ページ  
「東大、織毛病の原因遺伝子を確認—患者の DNA も解析」  
2008 年 12 月 4 日 (木) 06 時 03 分 時事通信  
「変異メダカから疾患遺伝子発見=細胞表面の織毛動かさず—東大  
など」  
2. Kasahara et al. *Nature* 447(7145):714-9 (2007). について  
2007 年 6 月 7 日 朝日新聞 33 面  
2007 年 6 月 7 日 東京新聞 26 面  
2007 年 6 月 7 日 毎日新聞 2 面  
2007 年 6 月 15 日 (金) 科学新聞 1 面  
3. Horikawa, K et al. *Nature* 441: 719-723 (2006). について  
2006 年 6 月 8 日 日経産業新聞 11 ページ  
2006 年 6 月 8 日 日刊工業新聞 News ウェーブ 21,24
- II. 工藤研究室  
1. 812251544  
心筋を修復し がん増殖を抑制? たんぱく質ペリオスチン  
研究最前線 毎日新聞 2008 年 3 月 2 日  
2. 812251536  
心臓修復するたんぱく質 朝日新聞 2008 年 1 月 25 日